

## Sugar surfactant の応用～油滴包括およびタンパク質安定化

今村維克, 石田尚之, 今中洋行

岡山大学大学院自然科学研究科化学生命工学専攻バイオプロセス工学講座

糖を親水基とする界面活性剤は古くから知られており, その物理化学的特性が報告されてきた. また, 糖系界面活性剤の合成および精製に関する研究も盛んに行われた. さらに近年は市販されている sugar surfactant のバリエーションも顕著に広がり, glucose や sucrose 以外に  $\alpha$ -maltose, trehalose を親水基とするものや, アルキル鎖長も様々な長さをもつものが, 試薬レベルの純度で入手することができるようになった. 今後, 臨界ミセル濃度や界面張力などの物性に及ぼす sugar surfactant の分子構造の影響が系統的に明らかにされていくものと考えられる. 一方, 筆者らは, これまでに種々の sugar surfactant を用いて, (1) 乳化した油滴の糖類アモルファスマトリクスへの包括特性, および (2) タンパク質の凍結乾燥時における安定化作用について検討してきた. 本稿では, それらの研究成果について紹介する.

**(1) 油滴微粒子の糖類 (凍結) 乾燥固体による包括特性に及ぼす各種界面活性剤の効果**

各種界面活性剤を用いて調製した O/W エマルジョン溶液を糖共存下で凍結乾燥したときの糖類アモルファスマトリクスによる油滴微粒子の包括特性を評価・比較した [1, 2].

**材料・方法** 油脂として linoleic acid methyl ester (LME), 糖として trehalose を主に用いた. 界面活性剤として, 糖と脂肪酸からなる種々のモノエステル (お

よびジ・トリエステル) と各種カチオン性, アニオン性界面活性剤など計 30 種類用いた. O/W エマルジョンは, 糖, 界面活性剤, 油相をそれぞれ 100 mg/mL, 20 mg/mL, 11 mg/mL の割合で混合し, ホモジナイザで乳化 (10,000 rpm, 2 min) することによって調製した. 得られた O/W エマルジョン溶液 (100  $\mu$ L) を液体窒素により急速凍結した後, 24 時間凍結乾燥した.

得られた乾燥試料と流動パラフィンを乳鉢中で混合した後, フーリエ変換赤外分光計により IR スペクトルを測定した. 油脂の C=O の伸縮振動に起因する Peak と糖の C-H の面外変角振動に起因する Peak とのエリア比から包括された油脂量を求め, 油滴微粒子の全添加量に対する包括率を算出した. なお, 包括されなかった油脂は容器器壁に付着していた. さらに凍結乾燥前後における試料中の油滴微粒子を濃厚系粒径アナライザで分析し, 油滴微粒子の粒径分布を測定した.

**結果** まず, 種々の界面活性剤を用いた場合の糖類アモルファスマトリクスによる油滴包括率を比較した結果, 両性・中性界面活性剤, とくに親水基が糖からなる界面活性剤を用いることで高度に油滴を包括することがわかった. また, 親水基の糖の構造によっても油滴包括率は異なり, 二糖ではトレハロースやパラチノースといった占有体積が大きいもの [3] で包括率が高い傾向が示唆された. 次に, 糖と脂肪酸の結合がエーテル結合とエステル結合のものを比較すると, 糖-脂肪酸エーテルより, 糖-脂肪酸エステルの方がより高い包括率を示すことがわかった (Fig. 1). これより, 界面活性剤のカルボニル基が糖マトリクスとの相互作用に重要な役割を担っている可能性が考えられる. アルキル鎖長が異なる sugar ester を比較すると, アルキル鎖長が長くなるに伴って包括率は上昇するが, ある鎖長以上になると包括率の減少がみられた (Fig. 2). IR スペクトルを解析した. その結果, アルキル鎖長が短いと油滴の脱落に関わらず, 糖類アモルファスマトリクス中に sugar ester はほぼすべて残留するのに対し, アルキル鎖長が長すぎると油滴微粒子とともに, 界面活性剤が脱落することがわかった. これらの結果から, sugar ester のアルキル鎖長が短すぎれば sugar ester には油滴表面から糖マトリクスに引き抜かれ, 逆にアルキル鎖が長すぎれば油滴に sugar ester が引き込まれる

**略歴**

平成 4 年 3 月 京都大学工学部化学工学科 卒業  
平成 6 年 3 月 京都大学大学院工学研究科化学工学専攻博士前期課程 修了  
平成 9 年 3 月 京都大学大学院工学研究科化学工学専攻博士後期課程 研究指導認定退学  
平成 9 年 4 月 岡山大学工学部生物機能工学科 助手  
平成 11 年 7 月 博士 (工学) 京都大学  
平成 15 年 12 月 同 助教授  
平成 23 年 6 月 岡山大学大学院自然科学研究科化学生命工学専攻教授

現在に至る

〒700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1

Fax: 086-251-8200, E-mail: kore@cc.okayama-u.ac.jp

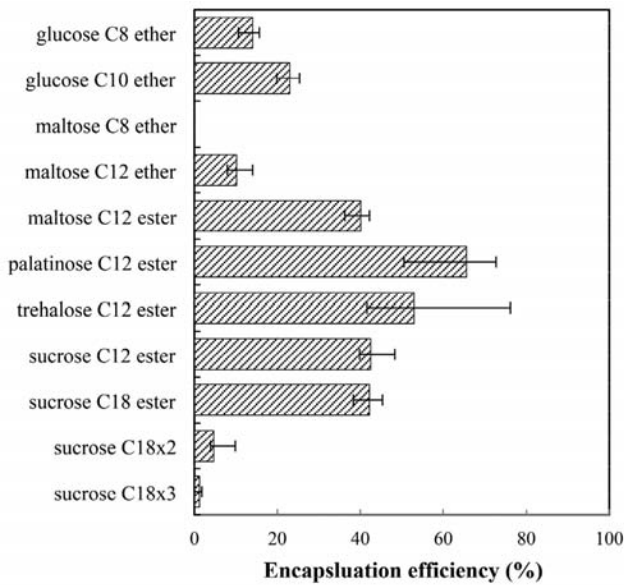


Fig. 1 LME encapsulation efficiencies for different head groups of sugar esters and ethers after freeze-drying in the presence of a sugar (100 mg/mL trehalose). The initial concentrations of sugar surfactant and LME were 20 mg/mL and 11.1 mg/mL, respectively. Error bars in the graph represent the highest and lowest values of all the measured values for each experimental condition.

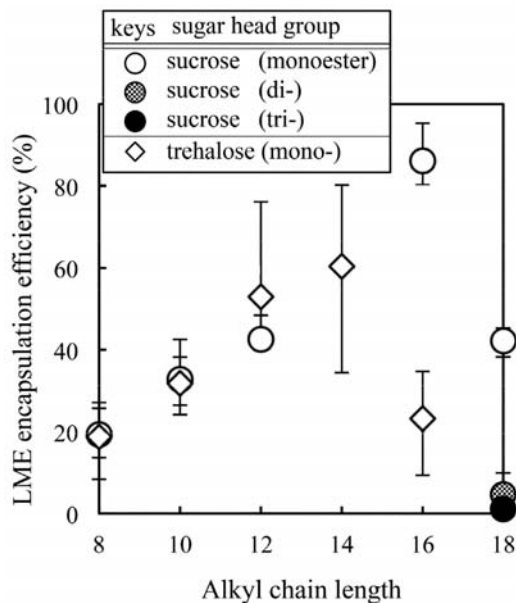


Fig. 2 LME encapsulation efficiency for sucrose and trehalose esters with different alkyl chain lengths. The concentrations of LME, sugar ester, and sugar (trehalose) in freeze-drying were 11.1 mg/mL, 20 mg/mL and 100 mg/mL, respectively. Error bars in the graph represent the highest and lowest values of all the measured values for each experimental condition.

ことにより油滴の脱落が生じるものと考えられる。さらに sucrose ester のモノエステルとジエステル、トリエステルを任意の割合で混合したときの油滴包括率を評価した。その結果、モノエステルとジエステルがそ

れぞれ単体で存在する場合よりも、複合した場合の方が包括率が高くなることがわかった。

## (2) 酵素の凍結及び凍結乾燥時における sugar surfactant の安定化効果

タンパク質 (酵素) 水溶液に各種 sugar surfactant を添加したときの、凍結および凍結乾燥時による酵素の失活度を測定比較した [4, 5].

**材料・方法** タンパク質 (酵素) として Ascorbate oxidase from *cucurbita species* (AO), Serine acetyl transferase from *escherichia coli* (SAT), Acetylcholinesterase from *electrophorus electricus* (AChE), Alcohol dehydrogenase from *saccharomyces cerevisias* (ADH), Alkaline phosphatase from *Calf intestine* (ALP) を用いた。各種酵素溶液に sugar surfactant をはじめとする添加物を 0~5000  $\mu\text{g/ml}$  加えた。この混合溶液を液体窒素で瞬間凍結し、その後直ちに室温で融解し、酵素活性を測定することにより、凍結時における安定化剤の効果を評価した。乾燥時における安定化効果については、上記の酵素-添加物混合溶液を液体窒素で瞬間凍結し、24 時間凍結乾燥を行った。その後、酵素を再溶解させたときの酵素活性を評価することにより安定化剤の効果を評価した。

## 結果

**凍結 (融解) 時のタンパク質 (酵素) 安定化効果** 凍結時に変性しやすい酵素である AO, SAT, AChE は凍結時に残存酵素活性が大きく低下する傾向にある。安定化剤として糖である sucrose を用いた場合、AO, SAT, AChE の残存酵素活性は改善されることがなく、十分な安定化効果を得られなかったのに対し、sugar surfactant を用いた場合は残存酵素活性が 90% 以上となり、かつ、少量の添加で済むという結果となった (Fig. 3)。また、アルキル鎖長の異なる sugar surfactant を用いた場合の結果を比較すると、最も高い安定化効果を有するアルキル鎖長は各酵素により異なったが、全体的にアルキル鎖長が短いものの方がより高度に安定化する傾向にあった (Fig. 3)。

糖界面活性剤の極性基が異なる場合について比較した結果 (Fig. 4)、二糖 (スクロース、トレハロース、マルトース) が極性基の場合はほとんど差が無く、アルキル鎖長が C10 の場合は、極性基が単糖 (グルコース) でも安定化作用の立ち上がり濃度は変化しなかった。しかし、アルキル鎖長が C8 と非常に短い場合は、極性基がグルコースの場合、立ち上がり濃度が 2 桁程度低くなった (Fig. 4)。アルキル鎖との結合様式がエーテル結合とエステル結合ではタンパク質安定化作用に差はみられなかった。

以上の結果など [6] から、凍結時における sugar surfactant によるタンパク質安定化の本質は sugar

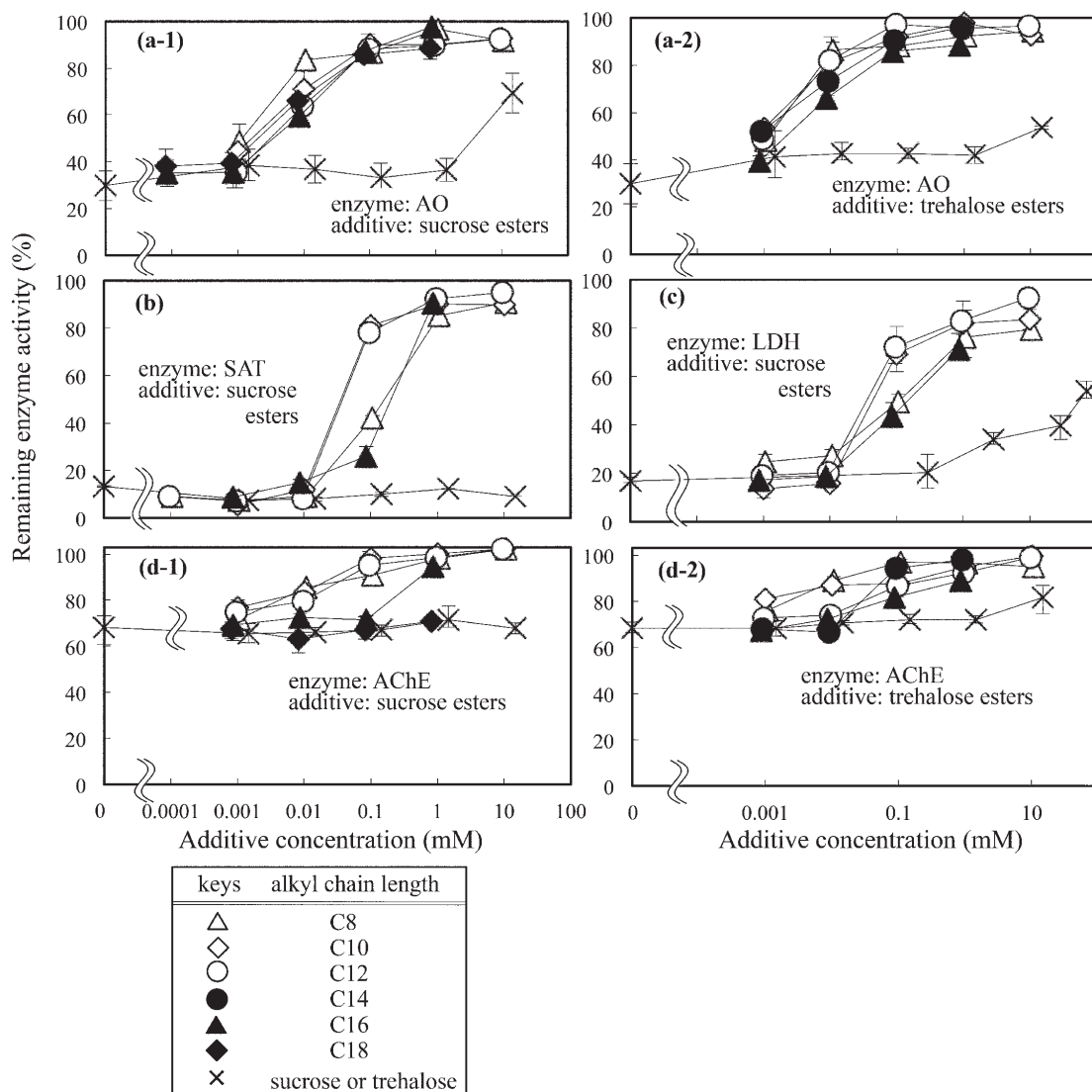


Fig. 3 Remaining activities of (a-1, 2) AO, (b) SAT, (c) LDH (c), and (d-1, 2) AChE after freeze/thawing in presence of C8~18 esters of sucrose and trehalose.

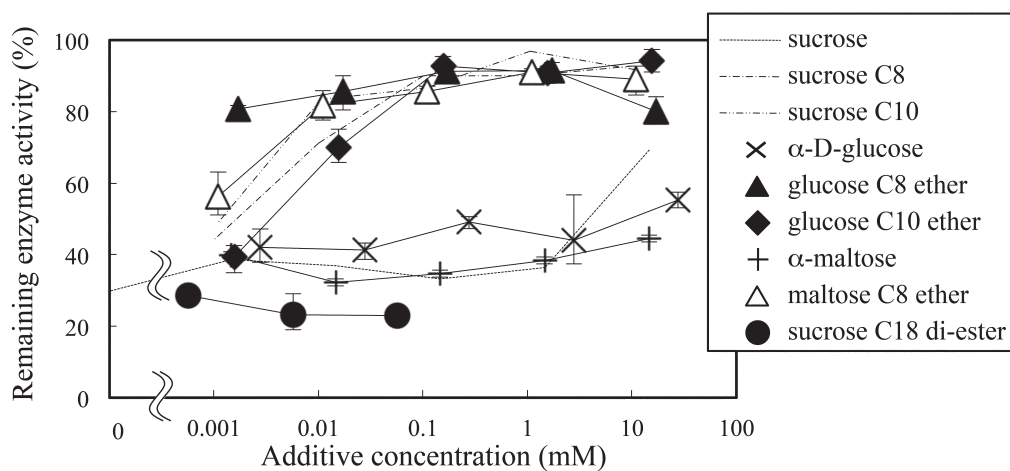


Fig. 4 Remaining enzyme (AO) activities after freeze/thawing in presence of sucrose and sucrose C12 ester ethers of  $\alpha$ -D-glucose (C8, C10) and  $\alpha$ -maltose (C8) and di-ester of sucrose (C18) as a function of additive concentration. The results for sucrose and sucrose esters (C8 and C12) are also shown for comparison.

surfactant とタンパク質の間の相互作用であると考えられることができる。一般的に糖類を含む各種物質による凍結時におけるタンパク質の安定化はタンパク質-添加物間の直接相互作用では無く、むしろ、タンパク質表面から添加物質を排除する“選択的水和 (Preferential hydration)” [7] によって説明されている。各種糖界面活性剤の凍結時におけるタンパク質安定化作用の大小は、現時点では次のように考えている。まず、いずれの糖界面活性剤も氷点下において不溶化し、ミセルや凝集体を形成する。このとき、アルキル鎖が長いほど安定な凝集体を形成し、タンパク質との間に相互作用は形成しにくい。一方、アルキル鎖が短いほど凝集体が不安定でタンパク質と相互作用を形成しやすいと考えられる。同様に極性基が二糖の場合に比べてグルコースの場合の方が界面活性剤の凝集体が不安定となり、タンパク質との相互作用がより形成されやすいと考えられる。

**凍結乾燥時のタンパク質 (酵素) 安定化効果** 凍結時に酵素活性が大きく低下しないものとして ADH, ALP を用いて、凍結時に酵素活性が顕著に低下するものとして AO, SAT, AChE を用いたところ、凍結乾燥後、全ての酵素の残存酵素活性が大きく低下する結果となった (Fig. 5)。安定化剤として sucrose を添加した場合、ADH, LDH, ALP の残存酵素活性は 80% 以上となり、高度に安定化できたのに対し、凍結時に変性しやすい AO, SAT, AChE に対しては全く安定化できないという結果となった (Fig. 5)。これは sucrose では凍結乾燥過程における凍結段階で、酵素を安定化することができなかったためである。一方、安定化剤として sugar surfactant を用いた場合、上記の全ての酵素を高度に安定化することができた (Fig. 5)。最も高い安定化効果を有するアルキル鎖長は各酵素により異なったが、アルキル鎖長が長いものの方が少量の添加で高度に安定化する傾向があった。また、いずれの酵素につ

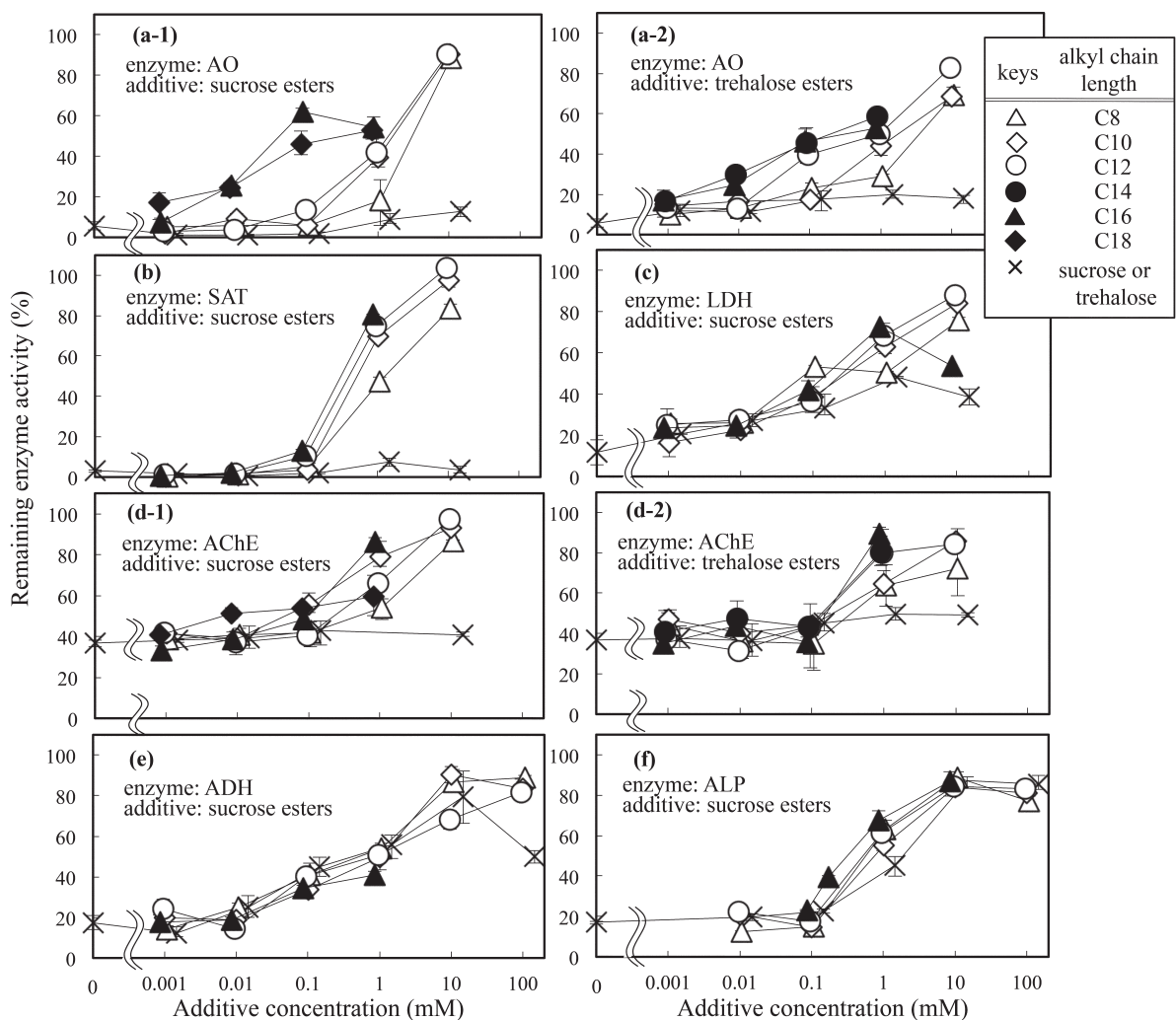


Fig. 5 Remaining activities of (a-1, 2) AO, (b) SAT, (c) LDH, (d-1, 2) AChE, (e) ADH, and (f) ALP after freeze-drying in presence of C8~18 esters of sucrose and trehalose. For comparison, the results for sucrose or trehalose are also shown in (a-1, b, c, d-1, e, f) and (a-2, d-2), respectively.

いても、残存酵素活性が立ち上がる糖界面活性剤の添加濃度は、凍結時より1~2桁高く、凍結変性を示さないADHとALPについては、残存酵素活性と糖界面活性剤の添加濃度の関係は糖の場合と一致した。これらのことから、凍結乾燥の脱溶媒過程における糖界面活性剤のタンパク質安定化機構は、糖によるものと同様[8]、アモルファスマトリクスの形成とタンパク質との間の相互作用（水素結合）によるものと考えられる。

#### 引用文献

- 1) S. Imamura, Y. Kimura, S. Nakayama, S. Miki, S. Ogawa, T. Hoshino, J. Oshitani, T. Kobayashi, S. Adachi, T. Matsuura, H. Imanaka, N. Ishida, K. Nakanishi, Characteristics of amorphous matrices composed of different types of sugars in encapsulating emulsion oil droplets during freeze-drying. *Food Res. Int.*, **51**, 201-207. (2013).
- 2) S. Nakayama, Y. Kimura, S. Miki, J. Oshitani, T. Kobayashi, S. Adachi, T. Matsuura, H. Imanaka, N. Ishida, H. Tada, K. Nakanishi, K. Imamura, Influence of sugar surfactant structure on the encapsulation of oil droplets in an amorphous sugar matrix during freeze-drying. *Food Res. Int.*, **70**, 143-149 (2015).
- 3) K. Imamura, Y. Maruyama, K. Tanaka, T. Yokoyama, H. Imanaka, K. Nakanishi, True density analysis of a freeze-dried amorphous sugar matrix. *J. Pharm. Sci.*, **97**, 2789-2797 (2008).
- 4) K. Imamura, K. Murai, T. Korehisa, T. Shimizu, R. Yamahira, T. Matsuura, H. Tada, H. Imanaka, N. Ishida, K. Nakanishi, Characteristics of sugar surfactants in stabilizing proteins during freeze-thawing and freeze-drying. *J. Pharm. Sci.*, **103**, 1628-1637 (2014).
- 5) 今村維克, (2014). オレオサイエンス, **14**, 487-493.
- 6) K. Izutsu, S. Yoshioka, T. Terao, Stabilization of  $\beta$ -galactosidase by amphiphilic additives during freeze-drying. *Int. J. Pharm.*, **90**, 187-194 (1993).
- 7) K. Gekko, S. N. Timasheff, Mechanism of stabilization by glycerol: Preferential hydration in glycerol-water mixtures. *Biochem.*, **20**, 4667-4676 (1981).
- 8) 例えば, M. J. Pikal, Freeze-drying of proteins. Process, formulation and stability. In *Formulation and delivery of proteins and peptides*; ACS Symposium Series., pp. 120-133 (1994).